

Sıçanların Lakrimal Bezlerinde Östrojen ve Progesteron Reseptörlerinin İmmunohistokimyasal Ekspresyonu

Emel ALAN^{1*}, Narin LİMAN¹

^{1,2}Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri/TÜRKİYE

Corresponding author e-mail: ealan@erciyes.edu.tr

ÖZ

Seks steroid hormonları (östrojen ve progesteron) spesifik reseptörleri aracılığıyla lakrimal bez fonksiyonlarının önemli düzenleyicisidirler. Bu hormonların eksikliği göz kuruluğu ile karakterize keratokonjunktivitis sikka (KCS) hastalığına neden olmaktadır. Sunulan çalışma, erişkin erkek sıçanların intraorbital ve ekstraorbital lakrimal bezinde östrojen reseptör α (ER α), östrojen reseptör β (ER β) ve progesteron reseptörlerinin (PR) immunohistokimyasal lokalizasyonlarını ortaya koymak amacıyla planlandı. Anestezi altında 8 adet erkek sıçandan elde edilen lakrimal doku örneklerine rutin histolojik prosedürü takiben Strep-ABC immunohistokimyasal boyama tekniği uygulandı. İntraorbital ve ekstraorbital bez epiteli, akıtıcı kanal epiteli, mioepitel ve kan damarların endotel hücrelerinin hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde değişen derecelerde ER α , ER β ve PR immunreaktivitesi saptandı. Her iki bezin bütün yapısal komponentlerinde ER α en yoğun olarak çekirdekte bulunurken, ER β 'nin en yoğun sitoplazmada lokalize olduğu tespit edildi. PR immunreaktivitesinin ise hem intraorbital hem de ekstraorbital bez epitelinin lateral membranlarında ve intraorbital bezin mioepitel hücrelerinde kuvvetli boyanma olduğu gözlemlendi. Aynı zamanda intraorbital bezlerde kan damarlarının etrafında bulunan mast hücrelerinde pozitif ER β immunreaksiyonu saptanırken, ekstraorbital bezin intersitsiyel bağ dokusu içinde ER α , ER β ve PR pozitif stromal hücrelere rastlandı. Sonuç olarak, erkek sıçanlarda intraorbital ve ekstraorbital bezin bütün yapısal komponentlerinde değişen derecelerde ER α , ER β ve PR immunreaktivitesinin saptanması lakrimal bezin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü sürdürmede östrojen ve progesteron hormonlarının reseptör bazlı etkisinin olduğu fikrini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Östrojen Reseptör, Lakrimal Bez, Progesteron Reseptör, Sıçan

Immunohistochemical Expression of Estrogen and Progesterone Receptors in the Lacrimal Glands of the Rats

ABSTRACT

Sex steroid hormones (estrogen and progesterone) are important regulators in lacrimal gland functions with the help of its specific receptors. The deficiency of these hormones causes disease of keratokonjunktivitis sicca (KCS) which is characterized with eye dryness. This study was aimed to show the immunohistochemical localization of the ER α , ER β and PR in intraorbital and extraorbital lacrimal glands of the rat. Following the routine histological procedure, the Strep-ABC immunohistochemical staining method was performed to the lacrimal gland samples obtained from 8 rats under anesthesia. Changing degrees of ER α , ER β and PR immunoreactivity were determined in cytoplasm and nucleus of the secretory epithelium, duct epithelium, mioepithelial cells and endothelial cells of the intraorbital and extraorbital gland. It was determined that ER α was found intensely in the nucleus of the all structural components of the two glands, whereas ER β was found intensely located in the cytoplasm. PR immunoreactivity was shown strongly in the lateral membranes of both gland epithelium and in the mioepithelial cells of the intraorbital glands. Also, positive ER β immunoreaction was detected in the mast cells around the blood vessels in the intraorbital glands, whereas ER α , ER β and PR positive stromal cells were detected in the interstitial connective tissue of the extraorbital gland. As a conclusion, changing degrees of ER α , ER β and PR immunoreactivity found in all structural components of both glands supports the idea that the receptor based estrogen and progesterone hormones have an effect on the maintainance of the structural and functional integrity of the lacrimal gland.

Key Words: Estrogen Receptor, Lacrimal Gland, Progesterone Receptor, Rat

To cite this article: Alan E, Liman N. Sıçanların Lakrimal Bezlerinde Östrojen ve Progesteron Reseptörlerinin İmmunohistokimyasal Ekspresyonu. *Kocatepe Vet.J. 2016; 9(2): 80-87.*

GİRİŞ

Seks steroid hormonları cinsiyet spesifiktir. Örneğin; erkeklerde androjen hormonu, dişilerde östrojen ve progesteron hormonları baskındır. Seks steroid hormonları yani östrojen, progesteron ve testosteron dişilerde ovaryum, erkeklerde ise testislerde üretilirler ve kanın sirkülasyonu ile hemen hemen vücudun bütün dokularına yayılırlar, fakat bu hormonlar hedef dokularda bulunan spesifik reseptörler aracılığıyla faaliyet gösterirler. Seks steroid hormon reseptörleri hedef dokularda yer alan hücrelerin çoğunlukla çekirdeğinde ve/veya sitoplazmasında lokalize olurlar, ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar bu reseptörlerin hücrelerin plazma membranından da izole edildiği yönündedir (Singh ve ark. 2002).

Östrojenler, erkeklerde ve dişilerde hem reproduktif hem de reproduktif olmayan dokularda büyüme, farklılaşma ve inflamatuvar yanıt gibi çeşitli hücreyel fonksiyonları düzenleyen seks steroid hormonlardır. Östrojen hormonunun fonksiyonuna spesifik çekirdek reseptör olan östrojen reseptörünün (ER) iki alt tipi (ER α ve ER β) ve onların izoformları aracılık etmektedir (Heldring ve ark. 2007). ER α , spesifik dişi dokularında rastlanılırken, ER β 'nın vasküler doku ve merkezi sinir sistemi gibi bir çok dokuda bulunduğu bildirilmektedir. Farklı yapıları ve dağılımları temel alındığında, ER izoformları farklı biyolojik aktiviteye sahiptir, fakat ER β 'nın fonksiyonu tam olarak anlaşılammıştır (Pavao ve Traish 2001).

Bir diğer steroid hormon olan progesteron hormonunun fizyolojik etkilerine ise progesteron reseptör (PR) adı verilen intrasellüler reseptörler aracılık etmektedir ve bu progesteron reseptörleri transkripsiyon faktörlerinin nüklear reseptör süper ailesinin bir üyesidir (Tsai ve O'Malley 1994). Progesteron ligandına bağlanma yoluyla nüklear reseptör ligand kompleksi hedef genlerin ekspresyonunu indüklemek için çekirdeğe transloke olur ve daha sonra progesteron hormonuna hedef hücrenin fizyolojik cevabının ortaya çıkmasına neden olur. Meme bezi gibi birçok dokuda PR, östrojen tarafından indüklenir. PR, PR-A ve PR-B olmak üzere iki izoformdan oluşur. Birçok hücrede PR-B, progesteron-duyarlı genlerin transkripsiyonal aktivatörleri olarak fonksiyon gösterirken, PR-A, bütün steroid hormon reseptörlerinin transkripsiyonal inhibitörü olarak fonksiyon göstermektedir (Vegeto ve ark. 1993). Nüklear PR'ü erkeklerin ve maymunların hipofiz, hipotalamus, epididimis, prostat, testis ve meme bezi gibi dokularında eksprese edilirken, dişilerde progesteron hormonunun hedef organları

ovaryum, uterus ve meme bezidir (Luetjens ve ark. 2006).

Östrojen ve progesteron reseptörleri, sıçan, tavşan ve insanların lens, retina/uvea, retina/koroid, retinal pigment epitel hücreleri, kornea, iris, korpus siliyare, lakrimal bez, lakrimal bez asiner epitel hücreleri, meibomian bez, göz kapağı, palpebral ve bulbar konjunktiva gibi çeşitli oküler dokuların yapısal ve fonksiyonel özelliklerinde önemli bir rol oynamaktadır. Aynı zamanda bu steroid hormon reseptörlerinin cinsiyet ve doku-spesifik farklılıklar içerdiği tespit edilmektedir. Buna göre; dişilerin retina/uvea örneklerinde östrojen ve progesteron reseptör mRNA'ları sırasıyla %50 ve %33.3 oranında bulunurken, erkek ve dişi sıçanların lensinde PR mRNA'ya rastlanmamaktadır (Wickham ve ark. 2000). İnsanlar üzerinde yapılan bir diğer çalışmada erkek ve kadınlar arasında lakrimal ve diğer göz ile ilişkili bezler, oküler yüzey, lens kristali, retinokoroid kompleksde farklılıklar bulunduğu ifade edilmektedir. Bu farklılıkların ise yaş, menstrual siklus, gebelik, menopoz veya andropoz gibi seks steroid hormon (östrojen, progesteron ve androjen) seviyelerindeki dalgalanmadan kaynaklandığı bildirilmektedir (Gupta ve ark. 2005). Kadınlarda menopoz sonrası, erkeklerde ise andropoz sonrası seks steroid hormon seviyelerinde azalma ile birlikte glokom ve lakrimal bez sekresyonunda azalma ile karakterize keratokonjunktivitis sikka (Sjögren sendromu) gibi göz hastalıklarının insidensinde artış meydana gelmektedir (Schaumberg ve ark. 2001).

Seks steroid hormonlarının aynı zamanda farelerin lakrimal bezinde moleküler fonksiyonlar, hücreyel komponentler ve biyolojik süreçlerde etkili olduğu gösterilmektedir. Örneğin; 17 β -östrodiol, progesteron ve kombine seks steroid hormon tedavisi, nükleik asit ve protein metabolizması, hücre büyüme, hücre iletişim, sinyal transdüksiyonu ve transkripsiyonal düzenleme ile ilişkili çok sayıda gen ekspresyonunu etkilemektedir (Suzuki ve ark. 2006).

Seks steroid hormonlar (östrojen ve progesteron), lakrimal doku üzerinde ya non-klasik yollar (membran reseptörleri) aracılığıyla ya da diğer hormonların kontrolü (hipofizden salgılanan) altında indirekt olarak etki göstermektedir (Hewitt ve ark. 2005). Klasik olmayan mekanizmalar, membran geçirgenliğinde değişiklikler, nörotransmitter reseptörlerin kontrolü ve spesifik plazma membran reseptörleri ile etkileşimdir. İndirekt mekanizmalar ise daha sonra göz üzerinde etki eden hipofiz hormonlarının serbest bırakılması yoluyla ortaya çıkan etkileri içermektedir (Brann ve ark. 1995).

Bir çok çalışmada seks steroid hormonlarının lakrimal bezin yapısal, fonksiyonel ve/veya patolojik özelliklerini ayarlayabileceğini ve bu hormonların faaliyetlerinin lakrimal bezin cinsiyetle ilişkili farklılıkların çoğundan sorumlu olduğu rapor edilmektedir. Ancak bu endokrin etkiye rağmen seks steroid hormonlarının etkisi altında yatan temel mekanizmalar ile ilgili çok az bilgiye rastlanmaktadır. Bu nedenle bizim amacımız hem lakrimal bezin çeşitli hastalıklarının tedavisinde kullanılacak hormonal terapötik stratejiyi belirlemek hem de lakrimal bezin fizyolojik fonksiyonunun düzenlenmesine yardımcı olmak amacıyla dişiler hariç (dişilerde hormonal dalgalanmadan dolayı) sadece erkek sıçanların hem intraorbital hem de ekstraorbital lakrimal bezlerinde ER α , ER β ve PR immunreaktivitesinin belirlenmesi amaçlandı.

MATERYAL VE METOT

Doku Temini

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi deney hayvanları merkezinde yetiştirilen 6-8 haftalık, ortalama ağırlıkları 250-300 gr olan Rattus norvegicus (Wistar albino) ırkı 8 adet erkek ergin sıçan kullanıldı. Sıçanlardan rompun ve ketalar anestezisi (Rompun 13 mg/kg, Ketalar 87 mg/kg) altında lakrimal bezin ekstraorbital ve intraorbital kısımları çıkartıldıktan sonra hayvanlar ötenazi edildi. Çıkartılan lakrimal bez örnekleri formol-alkol tespit solüsyonunda 12 saat tespit edildi. Sırasıyla dereceli alkoller, metil benzoat ve benzol solüsyonlarından geçirilerek parafinde bloklandı. Bu parafin bloklardan Leica RM 2125 rotary mikrotomu ile 4 μ m kalınlığında üç seri kesit alındı. Alınan seri kesitlere sırasıyla ER α , ER β ve PR'yi belirlemek için streptavidin-biotin-peroksidaz immunohistokimyasal teknik (Thermo Fisher Scientific Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA) uygulandı. Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanlığı tarafından onaylandı (karar no: 13/47).

İmmunohistokimyasal Analizler

İmmunohistokimyasal incelemeler için hazırlanan preparatlar deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden sonra distile suda çalkalanarak endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için metanolde hazırlanan %3' lük hidrojen peroksitte 15 dakika süreyle tutuldu ve PBS (Phosphate buffer saline, 0.01 M, pH:7.4)'de iki kez yıkandı. Ardından, bütün antikolar için 0.01 M sitrat buffer'da (pH:6.0) 30 dakika antijen retrieval işlemi yapıldı ve 20 dakika soğutma işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra, bir nem kamerası (Thermo Shandon, UK) içinde non-spesifik bağlanmaları engellemek için %10' luk keçi serumu (Ultra V Block, Thermo Fisher Scientific Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA; TA-125UB) ile 5 dakika süreyle inkube edildi. Bu işlemlerden sonra, kesitler ER α (MC-20, sc-542, Santa Cruz Biotechnology, USA, 1:50), ER β (ab-3576, Abcam,

USA, 1:50), ve PR (C-20, sc-539, Santa Cruz Biotechnology, USA, 1:100) primer antikolarıyla +4 °C de 1 gün süreyle buzdolabında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra kesitlere 20 dakika süreyle oda ısısında biotinli goat anti-rabbit sekonder antikoru uygulandıktan sonra avidin-peroksidaz solüsyonu (Labvision, Ultravision kit, TS-125-HR) ile 20 dakika muamele edildi. Her bir işlemten sonra kesitler PBS'de dört kez yıkandı. Antijen-antikor reaksiyonun görüntülenebilmesi için 5-10 dakika süreyle 3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB; Thermo Fisher Scientific Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA), ardından zemin boyaması için 5 dakika süreyle Gill'in hematoksileni uygulandı ve kesitler mavileşinceye kadar çeşme suyunda yıkandı. Son olarak alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek kesitler entellan ile kapatıldı. Kahverengi presipitasyonun görülmesi sonucunda reaksiyon pozitif olarak değerlendirildi ve ışık mikroskopunda (BX51; Olympus, Tokyo, Japan) incelenerek fotoğraflandı. Pozitif kontrol olarak, çalışmada kullanılan her bir primer antikor için insanlardan elde edilen meme karsinomu kullanıldı. Negatif kontroller olarak alınan doku örnekleri ise primer antikorsuz kullanılan antikorun hazırlandığı hayvan türüne göre non-immun serum ile muamele edildi.

Semi-kantitatif Analizler

İmmunohistokimyasal boyanma yoğunluk skoru (IS) kullanılarak semikantitatif olarak değerlendirildi (Brown ve Lamartiniere 2000). Yoğunluk skoru, sitoplazma, çekirdek ve membranda bulunan pozitif boyanma yoğunluğunu yansıtmaktadır. Bu metotda, yoğunluk skoru (IS); -: negatif, +: zayıf, ++: orta, +++: kuvvetli olarak değerlendirildi.

Hücrelerde immunohistokimyasal reaksiyonların yoğunluk skoru iki bağımsız araştırmacı tarafından incelendi (E.A., N.L.) ve bu iki araştırmacının ortalama skoru hesaplandı. Sıçanların ekstraorbital ve intraorbital lakrimal bezinde ER α , ER β , ve PR immunlokalizasyonları mikroskopta farklı büyütmelerde incelenerek dört farklı hücre grubunda değerlendirildi: Bez epitel hücreleri, akıtıcı kanal epitel hücreleri, miyoepitel hücreleri ve kan damarlarının endoteli.

BULGULAR

Lakrimal bezlerde ER α 'nın immunlokalizasyonu

İntraorbital bez epiteli, akıtıcı kanal epiteli, miyoepitel ve endotel hücrelerinin çekirdeğinde kuvvetli ER α immunreaksiyonuna rastlanırken, sitoplazmadaki reaksiyon orta dereceli idi. Ekstraorbital bez epitel hücrelerinin ve miyoepitel hücrelerinin çekirdeğinde de kuvvetli ER α immunreaksiyonuna rastlandı. Akıtıcı kanal epitel hücrelerinin hem çekirdeği hem de sitoplazmasında ise orta dereceli bir reaksiyon saptanırken, endotel hücrelerindeki reaksiyonun biraz daha zayıf olduğu

tespit edildi. İntersitisyel bağ doku bölmelerinde bulunan stromal hücrelerinin çekirdeğinde de kuvvetli ER α immunreaktivitesi saptandı (Şekil 1, Tablo 1).

Lakrimal bezlerde ER β 'nin immunlokalizasyonu
İntraorbital bez epiteli, akıtıcı kanal epiteli, miyoepitel ve endotel hücrelerinin sitoplazmasındaki ER β immunreaksiyonu çekirdeğe göre daha kuvvetli idi. Kan damarlarının etrafında bulunan mast hücrelerinde de pozitif immunreaksiyon saptandı. Aynı şekilde ekstraorbital bez epiteli, akıtıcı kanal epiteli ve miyoepitel hücrelerinin sitoplazmasında kuvvetli ER β immunreaksiyonuna rastlandı. Endotel hücrelerinde ise orta dereceli bir reaksiyon gözlemlendi. Ayrıca ekstraorbital lakrimal bezin intersitisyel bağ dokusu (stroma) içinde sitoplazması ER β pozitif stromal hücreler tespit edildi (Şekil 2, Tablo 1).

Lakrimal bezlerde PR'nin immunlokalizasyonu
İntraorbital bez epiteli, akıtıcı kanal epiteli ve endotel hücrelerinin hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde orta dereceli PR immunreaksiyonuna rastlanılırken, miyoepitel hücrelerindeki reaksiyonun daha kuvvetli olduğu belirlendi. Aynı zamanda her iki bezin salgı epitel hücrelerinin lateral membranlarında PR pozitif immunreaksiyonuna rastlandı. Ekstraorbital bezde ise akıtıcı kanal epitel hücrelerinin sitoplazmasındaki PR immunreaksiyonunun bez epitel hücrelerinden daha yoğun olduğu tespit edildi. Miyoepitel ve endotel hücrelerinde orta dereceli bir reaksiyon gözlemlendi. Ayrıca ekstraorbital lakrimal bezin intersitisyel bağ dokusu (stroma) içinde PR pozitif stromal hücrelere rastlandı (Şekil 3, Tablo 1).

Negatif kontrol olarak alınan lakrimal bez doku örnekleri ise primer antikorsuz kullanılan antikorun hazırlandığı hayvan türüne göre non-immun serum ile muamele edildiğinde hiçbir immunreaksiyon saptanmadı (Şekil 4).

TARTIŞMA

Östrojenlerin lakrimal bezin anatomi, fizyoloji ve seksüel dimorfizmde önemli bir rol oynadığı ortaya koyulmuştur. Buna göre; ovariektomi ve antiöstrojen tedavilerinin lakrimal bezin asiner hücrelerinde bozulma ve nekrozis, hücresel vakuolizasyon, DNA parçalanması, inflamasyon, glandular doku kaybı ve kuru göz sendromuna (dry eye syndrome, DES) neden olduğu (Azzarolo ve ark. 2003; Krawczuk-Hermanowiczowa 1983), östrojen uygulamalarının ise lakrimal bez yapısında ve fonksiyonundaki bu değişiklikleri düzelttiği ve lakrimal sekresyonu artırdığı ifade edilmiştir (Krawczuk-Hermanowiczowa 1983; Lauria ve Porcelli 1979). Diğer çalışmalarda ise ne östrojen yetersizliğinin ne de östrojen tedavisinin lakrimal bezin sekresyonu, lenfosit infiltrasyonu, spesifik enzim aktivitesi, total protein içeriği, ağırlığı, morfolojisi üzerinde hiçbir etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir (Lauria ve Porcelli

1979; Sullivan ve ark. 1984). Östrojenlerin lakrimal doku üzerinde negatif bir etkiye sahip olduğunu gösteren başka bir çalışmada ise östrojenlerin, glandular regresyon, protein üretimini baskılama, androjen ile zıt etkileşim ve göz yaşında azalmaya yol açtığı rapor edilmiştir (Lauria ve Porcelli F. 1979; Ranganathan ve De 1995). Sunulan çalışmada sıçan lakrimal bezlerinde ER α ve ER β 'nin sadece immunlokalizasyonu incelenmiş ve dolayısıyla lakrimal bezin östrojen hormonunun hedefinde yer aldığı tespit edilmiştir. Fakat çalışmanın yapıldığı bu erkek sıçanlara herhangi bir işlem yapılmadığı (kastasyon gibi) için östrojenin lakrimal bez üzerinde ne düzeyde bir etkiye sahip olduğu saptanamamıştır ve dolayısıyla farklı deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Şimdiye kadar insanların ve memeli hayvanların (fare, tavşan, sıçan gibi) çeşitli oküler dokularında (kornea, retina, konjunktiva, lakrimal bez, meibomian bez, iris, lens, siliar cisim) çoğunlukla ER ve daha az oranda PR'nin varlığı araştırılmıştır. Bu çalışmalara göre; Esmaeli ve ark (2000) hem erkeklerde hem de dişilerde üst göz kapağının meibomian bezlerinde östrojen reseptörlerini (ER α) tanımlamıştır. İnsan (Hadeyama ve ark. 2002) ve fare korneasında (Tachibana ve ark. 2000) RT-PCR yöntemi ile yapılan bir çalışmada ER'i saptanmıştır. Hadeyama ve ark (2002) da aynı şekilde insan korneasında ER α , ER β ve PR immunreaktivitesini belirlerken, ER β mRNA'sı hem insan korneasından hem de retinasından izole edilmiştir (Suzuki ve ark. 2001; Munaut ve ark. 2001). Bu çalışmalara zıt olarak Vécsei ve ark (2000) insan korneasında immunohistokimyasal olarak ER'i belirleyememiştir. İnsanların konjunktiva, lakrimal bez ve tarsal plak gibi göze ait dokularında yapılan başka bir çalışmada RT-PCR yöntemi değişen derecelerde ER α mRNA ekspresyonuna rastlanırken, ER β mRNA'nın özellikle lakrimal bezde eksprese olduğunu ve ER α immunreaktivitesinin ise bu dokularda oldukça zayıf (ısıya duyarlılığından dolayı) olduğu sonucuna varılmıştır (Spelsberg ve ark. 2004). Fuchsjaeger-Mayrl ve ark (2002) RT-PCR ve western blot tekniği ile yapmış olduğu araştırmada premenopoz dönemi kadınların konjunktivasında ER α , ER β ve PR'nin varlığını ortaya koymuştur ve bu araştırmacılar seks steroid reseptörlerinin varlığının konjunktivanın olgunlaşması, kadeh hücre olgunlaşması ve allerjik cevapta seks steroid indüklemeli değişikliklerin meydana gelmesi için gerekli olduğu şeklinde yorumlamıştır. Bu çalışmalara zıt olarak insan konjunktivasında ER ve PR'nin negatif olduğu tespit edilmiştir (Gans ve ark. 1990). Bunun dışında oküler dokularda yapılan diğer çalışmalarda ER α immunreaktivitesinin siliar cisim, iris ve lens epitelinde (Ogueta ve ark. 1999), sıçan, tavşan ve insanların lakrimal bezlerinde ise ER mRNA eksprese edilmiştir (Wickham ve ark. 1998). Dolayısıyla insan konjunktivasında ER ve PR'i (Gans

ve ark. 1990) ve insan korneasında ER'i (Véscei ve ark. 2000) saptayamayan çalışmalara zıt olarak, sıçanların ve insanların lakrimal bezlerinde ER mRNA'yı saptayan çalışmalarla (Wickham ve ark. 1998; Spelsberg ve ark. 2004) benzer şekilde bizim çalışmamızda da sıçanların her iki lakrimal bezinin bütün yapısal komponentlerinde ER α , ER β ve PR immunreaktivitesi saptanmıştır.

Sıçanlarda intraorbital ve ekstraorbital lakrimal bezin salgı epiteli, akıtıcı kanal epiteli, miyoepitel ve endotel hücrelerinin sitoplazmasında, çekirdeğinde ve lateral membranlarda farklı yoğunlukta ER α , ER β ve PR immunlokalizasyonu tespit edilmiştir. Her iki bezde ER α immunreaktivitesi en yoğun olarak çekirdekte rastlanırken, ER β immunreaktivitesi sitoplazmada daha yükündür. PR immunreaktivitesine ise sitoplazmik ve çekirdek reaksiyonları dışında bez epitel hücrelerinin lateral membranlarında pozitif olarak belirlenmiştir. Şimdiye kadar yapılan immunohistokimyasal ve immunositokimyasal analizler temel alındığında, Abdo ve ark (2009), albino sıçanların lakrimal bezlerinde yer alan asiner (bez epiteli, salgı epiteli, korpus glandula) hücrelerinin çekirdeğinde kuvvetli ER immunreaktivitesine rastlarken bazı araştırmacılar sıçanın lakrimal dokusunda ER'i saptayamamış ya da önemsiz düzeyde bulmuştur (Sullivan ve ark. 1996). Gligorijević ve ark (2011) insanların lakrimal bezlerinin asiner hücrelerinde ER ve PR immunohistokimyasal ekspresyonunun hem sitoplazmada hem de çekirdekte lokalize olduğunu rapor etmiştir. Camacho-Arooyo ve ark (1999) tavşanların submandibular tükürük bezinde yapmış olduğu çalışmada ER ve PR'ini asiner hücrelerinin çekirdeğinde lokalize olduğunu bildirmişlerdir. Tükürük bezi üzerinde yapılan başka bir çalışmada ER α ve ER β proteinlerinin tükürük bezi epitel hücrelerinde hem çekirdek hem de sitoplazmik olarak lokalize olduğu ifade edilmiştir. Çeşitli hücrelerde ER yoğunlukla sitoplazmada bulunduğunu, ancak sitoplazmik ER'in tam olarak rolünün bilinmediği bildirilmiştir (Heldring ve ark. 2007). Hem çekirdek hem de sitoplazmada bu reseptörlerin lokalizasyonundan bahseden çalışmalara (Heldring ve ark. 2007; Gligorijević ve ark. 2011) paralel olarak bizim çalışmamızda da ER α , ER β ve PR'ünün hem sitoplazmada hem de çekirdekte lokalize olduğu ve ayrıca PR'nün hücre membranında da lokalize olduğu saptanmıştır. ER'ünün subsellüler lokalizasyonlarının, ER'ünün nüklear translokasyonunu indükleyen fosforilasyon gibi post-translasyonel mekanizmalar tarafından düzenlendiği rapor edilmiştir. Aynı zamanda belirli ER izoformlarındaki bir nüklear lokalizasyon sinyal sekanslarının eksikliği (Herynk ve Fuqua 2004) ve ER-spesifik represor proteinlerle etkileşim, ER proteinlerinin sitoplazmik lokalizasyonunu belirlediği gösterilmiştir. Sitoplazmik ER'ünün oluşumu diğer hücrel kompartmanlara yer değiştirme seyrinde

olan reseptör havuzunu göstermektedir (Heldring ve ark. 2007).

Yapılan çalışmalarda insanlarda lakrimal bezlerin modifiye tükürük bezleri olduğu ifade edilmektedir. Morfolojik olarak lakrimal bezler ve tükürük bezleri birbirine benzer olmasına rağmen, pars inisyalis ve pars sekretorya tükürük bezlerinde identifiye edilirken, lakrimal bezde bu iki kanal tanımlanmamıştır. İmmunohistokimyasal olarak bazı minor farklılıklarla birlikte lakrimal bezlerde intralobuler ve interlobuler kanallardan bahsedilmektedir (Iwamoto ve Jakobiec 1985). Sunulan çalışmada ER α , ER β ve PR immunreaktivitesi sıçanların intraorbital ve ekstraorbital bezlerinin akıtıcı kanal epitelinde incelenmiş olup bu akıtıcı kanallarının sınıflandırılması yapılmamıştır. Reaksiyon tek bir akıtıcı kanal başlığı altında incelenmiştir. Dolayısıyla bu çalışmaya göre ekstraorbital bezlerinin akıtıcı kanal epitel hücrelerinin sitoplazmasındaki ER β immunreaktivitesi çekirdeğe oranla daha fazla iken, PR immunreaktivitesinin hem sitoplazmada hem de çekirdekte kuvvetli olduğu ve ER α immunreaktivitesinin ise her iki kompartmanda orta dereceli olduğu tespit edilmiştir. İntraorbital bezde ise ER α immunreaktivitesi en çok kanal epitel hücrelerinin çekirdeğinde rastlanırken, ER β immunreaktivitesi sitoplazmada saptanmıştır. PR immunreaktivitesinin ise hem sitoplazmada hem de çekirdekte orta dereceli olduğu belirlenmiştir. Tsinti ve ark (2009) insanların tükürük bezlerinde yer alan bütün akıtıcı kanal (pars inisyalis, pars sekretorya, pars ekskretorya) epitel hücrelerinin hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde ER α , ER β 1 ve ER β 2 immunreaktivitesine rastlandığını ve kanallar arasında ER'nin immunreaktivite yoğunluğu açısından hiç bir farklılık olmadığını ifade etmiştir. Ancak insanların tükürük bezinde yapılan başka bir çalışmada ER β proteini eksprese edilirken, ER α proteinine rastlanmamıştır (Valimaa ve ark. 2004). İnsanların tükürük bezinde ER α saptayamayan çalışmaya zıt olarak sıçanların her iki lakrimal bezinde ER α immunreaktivitesi tespit edilmiştir. Dolayısıyla dişi tavşanlarda ER ile β -adrenerjik ve muskarinik kolinerjik reseptörlerinin sayısı arasında bağlantı olduğunu ve böylelikle lakrimal bez fonksiyonunun etkilendiğini tespit eden çalışmaya (Huang ve ark. 1995) benzer olarak sıçanların lakrimal bezi üzerinde de östrojen reseptörlerinin böyle bir etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir.

Hadeyama ve ark (2002) ER α immunreaktivitesinin kornea epiteli ve stroma hücrelerinde, ER β ve PR immunreaktivitesinin ise kornea epiteli, stroma ve endotel hücrelerinde lokalize olduğunu tespit etmiştir. Bu çalışmada sıçanların her iki lakrimal bezinin salgı epiteli, akıtıcı kanal epiteli, miyoepitel ve intersitisyel bağ dokuda yer alan stromal hücrelerinde ER α , ER β ve PR immunreaktivitesine, aynı zamanda kan damarlarının etrafında yer alan mast hücrelerinde ER β immunreaktivitesine rastlanmıştır. Dolayısıyla

lakrimal bezin epitel ve stromal hücrelerinde bu seks steroid hormon reseptörlerinin tespit edilmesi östrojenin, lakrimal bezde yer alan asiner hücrelerin fonksiyonunu ve yapısını sürdürmek için lakrimal intersitisyel hücreler üzerinde direkt etkiye sahip olduğunu ifade etmektedir. Bu durum meme bezinde olduğu gibi stromal ER'nin östrojen bağımlı epiteliyal proliferasyonda önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Cooke ve ark. 1998).

Sunulan çalışmada ayrıca intraorbital ve ekstraorbital lakrimal bezde yer alan endotel hücrelerinin çekirdeğindeki ER α immunreaksiyonu sitoplazmaya oranla daha fazla iken, ER β immunreaksiyonunun sitoplazmada daha yoğun olduğu tespit edilmiştir. PR immunreaktivitesinin ise her iki bezde yer alan endotel hücrelerinin hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde orta dereceli olduğu saptanmıştır. Stefano ve ark (2000) östrojenin fizyolojik dozajının hücre yüzey östrojen reseptörünün aktivasyonu ve artan intrasellüler kalsiyum konsantrasyonu ile birlikte insan endotel hücrelerden nitrik oksit serbest bırakılmasını stimüle ettiğini rapor etmiştir. Yanagiya ve ark (1997) tavşan korneasında nitrik oksit kornea endoteli tarafından üretildiğini ve nitrik oksit/siklik GMP yolağının kornea kalınlığını devam ettirmek için gerekli olduğunu ve dolayısıyla östrojenin kornea üzerinde indirekt etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada sıçanların ekstraorbital ve intraorbital lakrimal bezinde yer alan endotel hücrelerinde ER α , ER β ve PR immunreaksiyonunun tespit edilmesi, lakrimal bezde de endotel hücrelerinin östrojen ve progesteron hormonlarının hedefinde olduğunu ve bu hormonlarının etkisiyle endotel hücrelerinden nitrik oksit serbest bırakılmasını indüklediği tahmin edilmektedir.

Göze ait dokular üzerinde yapılan çalışmalarda ER ve PR'nin immunlokalizasyon ve ekspresyonlarının yaşa ve cinsiyete bağlı olarak değiştiği ifade edilmiştir. Bu çalışmalara göre; Gligorijević ve ark (2011) insanların lakrimal bezlerinin asiner hücrelerinde ER ve PR ekspresyonunun yaşa ve cinsiyete bağlı olarak değiştiğini ve incelenen bu her iki reseptöründe bütün dişilerde rastlanırken, erkeklerin sadece %20'sinde saptandığı bildirilmiştir. Aynı zamanda Abdo ve ark (2009) ER'nin daima dişi sıçanların lakrimal bezinde bulunduğunu, erkek sıçanlarda ilk üç aydan sonra lakrimal bezlerinde PCR yöntemiyle ER'yi saptayamadığını ifade etmiştir. Wickham ve ark (2000) insan, tavşan ve sıçanların çeşitli oküler dokularında bu steroid hormon reseptörlerinin cinsiyet ve doku-spesifik farklılıklar içerdiğini ve buna göre; dişilerin retina/uvea örneklerinde ER ve PR mRNA'ları sırasıyla %50 ve %33.3 oranında bulunurken, erkek ve dişi sıçanların lensinde PR mRNA'ya rastlanmadığı bildirilmiştir. Genç dişi gözlerinin retina ve retinal pigment epitelinde ER α ekspresyonunda cinsiyet ve yaşa bağlı farklılıklar saptanırken, erkeklerde ve postmenopoz dönemi

dişilerde göz dokusunda bu reseptörler saptanmamıştır (Ogueta ve ark. 1999). Dolayısıyla şimdiye kadar göze ait dokular üzerinde seks steroid hormon reseptörlerinin lokalizasyonunun yaşa ve cinsiyete göre değiştiğini ifade eden çalışmalara zıt olarak Spelsberg ve ark (2004) insanların konjunktiva, lakrimal bez ve tarsal plak gibi göze ait dokularında ne ER α ve ER β mRNA ekspresyonu açısından ne de ER α immunreaktivitesi açısından yaşa ve cinsiyete bağlı farklılıkların istatistiksel açıdan önemli olmadığını ifade etmiştir. Aynı zamanda önceki çalışmalarda ER ve PR'nin erkeklerden ziyade kadınlarda daha fazla oranda bulunduğunu ve incelenen her iki reseptördende ER'nin PR den daha fazla oranda eksprese olduğu rapor edilmiştir. Sunulan çalışmada ise dişilerde hormonal dalgalanmadan dolayı (menstrual siklus, gebelik, menopoz) sadece erişkin erkek sıçanların lakrimal bezinde ER α , ER β ve PR immunlokalizasyonları semikantitatif olarak değerlendirilmiş ve erkekler ile dişiler arasında herhangi bir kıyaslama yapılmamıştır.

SONUÇ

Sunulan bu çalışmada erkek sıçanların intraorbital ve ekstraorbital lakrimal bezlerinin salgı epiteli, akıtıcı kanal epiteli, miyoepitel ve kan damarlarının endotel hücrelerinde değişen derecelerde ER α , ER β ve PR immunlokalizasyonları incelenmiştir. Elde edilen veriler semikantitatif immunohistokimyasal analizler ile sınırlı olduğundan ve bu reseptörlerin sadece erkek sıçanların lakrimal bezlerinde incelendiğinden bu reseptörlerin görevlerinin tam olarak anlaşılabilmesi için farklı deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak, sıçanların hem intraorbital hem de ekstraorbital lakrimal bezlerinin bütün yapısal komponentlerinde ER α , ER β ve PR immunreaktivitesinin tespit edilmesi erkeklerde de lakrimal dokunun östrojen ve progesteron hormonları için hedef organ olduğu hipotezini desteklemektedir.

KAYNAKLAR

- Abdo FK, EL-Gammal AA, Abdel Fattah EA, Abdel-Haleim MR.** The role of hormone replacement therapy on structural integrity of lacrimal gland in ovariectomized albino rats (histological and immunohistochemical study). *Egypt J Histol.* 2009; 32: 66-80.
- Azzarolo AM, Eihausen H, Schechter J.** Estrogen prevention of lacrimal gland cell death and lymphocytic infiltration. *Exp Eye Res.* 2003; 77: 347-354.
- Brann DW, Hendry LB, Mahesh VB.** Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1995; 52: 113-133.

- Brown NM, Lamartiniere CA.** Genistein regulation of transforming growth factor- α , epidermal growth factor (EGF), and EGF Receptor expression in the rat uterus and vagina. *Cell Growth Differ.* 2000; 11: 255-260.
- Camacho-Arroyo I, Cerbón MA, Gamboa-Domínguez A, González-Agüero G, González-Mariscal G.** Immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptors in the rabbit submandibular gland. *Comp Biochem Physiol A.* 1999; 123: 179-186.
- Cooke PS, Buchanan DL, Lubahn DB, Cunha GR.** Mechanism of estrogen action: Lessons from the estrogen receptor- α knockout mouse. *Biol Reprod.* 1998; 59: 470-475.
- Esmaeli B, Harvey JT, Hewlett B.** Immunohistochemical evidence for estrogen receptors in meibomian glands. *Ophthalmology* 2000; 107: 180-184.
- Fuchsjäger-Mayrl G, Nepp J, Schneeberger C, Sator M, Dietrich W, Wedrich A, Huber J, Tschugguel W.** Identification of estrogen and progesterone receptor mRNA expression in the conjunctiva of premenopausal woman. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43: 2841-2844.
- Gans LA, Lee SF, Lemp MA, Pepose JS.** Estrogen and progesterone receptors and human conjunctiva. *Am J Ophthalmol.* 1990; 109: 474-477.
- Gligorijević J, Krstić M, Babić G.** Immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptors in the human lacrimal gland. *Arch Biol Sci Belgrade.* 2011; 63: 319-324.
- Gupta PD, Johar K Sr, Nagpal K, Vasavada AR.** Sex hormone receptors in the human eye. *Surv Ophthalmol* 2005; 50: 274-284.
- Hadeyama T, Nakayasu K, Ha NT, Nakamura S.** Expression of estrogen receptors α and β , androgen receptors and progesterone receptors in human cornea. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi.* 2002; 106: 557-564.
- Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA.** Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* 2007; 87: 905-931.
- Herynk MH, Fuqua SA.** Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Rev.* 2004; 25: 869-898.
- Hewitt SC, Deroo BJ, Korach KS.** Signal transduction: a new mediator for an old hormone? *Science* 2005; 307: 1572-1573.
- Huang ZM, Azzarolo AM, Mircheff AK, Esrail R, Grayson G, Heller K, et al.** Does estrogen directly affect lacrimal gland function? *ARVO Abstract, Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36: S2979
- Iwamoto T, Jakobiec FA.** Lacrimal glands. In: Duane TD, Jaeger EA, eds. *Biomedical foundation of ophthalmology.* Vol 1. Revised ed. Philadelphia, Harper & Row, 1985; 30, 1.
- Krawczuk-Hermanowiczowa O.** Effects of sexual glands on the lacrimal gland. II. Changes in rat lacrimal glands after castration. *Klin Oczna* 1983; 85: 15-17.
- Lauria A, Porcelli F.** Leucine aminopeptidase (LAP) activity and sexual dimorphism in rat exorbital gland. *Basic Appl Histochem* 1979; 23: 171-177.
- Luetjens CM, Didolkar A, Kliesch S, Paulus W, Jeibmann A, Böcker W, Nieschlag E, Simoni M.** Tissue expression of the nuclear progesterone receptor in male non-human primates and men. *J Endocrinol.* 2006; 189: 529-539.
- Munaut C, Lambert V, Noël A, Frankenne F, Deprez M, Foidart JM, Rakic JM.** Presence of oestrogen receptor type β in human retina. *Br J Ophthalmol.* 2001; 85: 877-882.
- Ogueta SB, Schwartz SD, Yamashita CK, Farber DB.** Estrogen receptor in the human eye: influence of gender and age on gene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40: 1906-1911.
- Pavao M, Traish AM.** Estrogen receptor antibodies: specificity and utility in detection, localization and analyses of estrogen receptor α and β . Review article. *Steroids.* 2001; 66: 1-16.
- Ranganathan V, De PK.** Androgens and estrogens markedly inhibit expression of a 20 kDa major protein in hamster exorbital lacrimal gland. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 208: 412-417.
- Schaumberg DA, Buring JE, Sullivan DA, Dana MR.** Hormone replacement therapy and dry eye syndrome. *JAMA.* 2001; 286: 2114-2119.
- Singh S, Shaul PW, Gupta PD.** Conventional estrogen receptors are found in the plasma membrane of vaginal epithelial cells of the rat. *Steroids.* 2002; 67: 757-764.
- Spelsberg H, Klueppel M, Reinhard T, Glaeser M, Niederacher D, Beckmann MW, Sundmacher R.** Detection of Oestrogen receptors (ER) α and β in conjunctiva, lacrimal gland, and tarsal plates. *Eye.* 2004; 18: 729-733.
- Stefano GB, Prevot V, Beauvillain JC, Cadet P, Fimiani C, Welters I, Fricchione GL, Breton C, Lassalle P, Salzet M, Bilfinger TV.** Cell-surface estrogen receptors mediate calcium-dependent nitric oxide release in human endothelia. *Circulation* 2000; 101: 1594-1597.

- Sullivan DA, Bloch KJ, Allansmith MR.** Hormonal influence on the secretory immune system of the eye: androgen regulation of secretory component levels in rat tears. *J Immunol.* 1984; 132: 1130-1135.
- Sullivan DA, Edwards JA, Wickham LA, Pena JD, Gao J, Ono M, Kelleher RS.** Identification and endocrine control of sex steroid binding sites in the lacrimal gland. *Curr Eye Res.* 1996; 15: 279-291
- Suzuki T, Kinoshita Y, Tachibana M, Matsushima Y, Kobayashi Y, Adachi W, Sotozono C, Kinoshita S.** Expression of sex steroid hormone receptors in human cornea. *Curr Eye Res.* 2001; 22: 28-33.
- Suzuki T, Schirra F, Richards SM, Trister NS, Lombardi MJ, Rowley P, Jensen RV, Sullivan DA.** Estrogen's and progesterone's impact on gene expression in the mouse lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47: 158-168.
- Tachibana M, Kasukabe T, Kobayashi Y, Suzuki T, Kinoshita S, matsushima Y.** Expression of estrogen receptor alpha and beta in the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41: 668-670.
- Tisinti M, Kassi E, Korkolopoulou P, Kapsogeorgou E, Moutsatsou P, Patsouris E, Manoussakis MN.** Function estrogen receptors alpha and beta are expressed in normal human salivary gland epithelium and apparently mediate immunomodulatory effects. *Eur J Oral Sci.* 2009; 117: 498-505.
- Tsai M-J, O'Malley BW.** Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann Rev Biochem.* 1994; 63: 451-486.
- Valimaa H, Savolainen S, Soukka T, Silvonieminen P, Makela S, Kujari H, Gustafsson JA, Laine M.** Estrogen receptor-beta is the predominant estrogen receptor subtype in human oral epithelium and salivary glands. *J Endocrinol.* 2004; 180: 55-62.
- Vegeto E, Shanbaz MM, Wen DX, Golman ME, O'Malley BW, McDonnell DP.** Human progesterone receptor A form is a cell and promoter specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol.* 1993; 7: 1244-1255.
- Véscei PV, Kircher K, Kaminski S, Nagel G, Breitenecker G, Kohberger PD.** Immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptor in human cornea. *Maturitas.* 2000; 36: 169-172.
- Wickham LA, Gao J, Toda I, Rocha EM, Ono M, Sullivan DA.** Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNAs in the eye. *Acta Ophthalmol Scand.* 2000; 78: 146-153.
- Wickham LA, Rocha EM, Gao J, Krenzer KL, da Silveira LA, Toda I, Sullivan DA.** Identification and hormonal control of sex steroid receptors in the eye. *Adv Exp Med.* 1998; 438: 95-100.
- Yanagiya N, Akiba J, Kado M, Yoshida A, Kono T, Iwamoto J.** Transient corneal edema induced by nitric oxide synthase inhibition. *Nitric Oxide.* 1997; 1: 397-403.